

© Е.Ю. МОРГУНОВА, Е. ФРАЙ, Д. СТЮАРТ,  
З. ДАУТЕР, К. ВИЛСОН, академик Б.К. ВАЙНШТЕЙН

СТРУКТУРА СФЕРИЧЕСКОГО ВИРУСА CARNATION MOTTLE (CMtV)  
ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 3,5 Å

Изучение структуры малых растительных вирусов становится все более необходимым для понимания функций и взаимодействия белковой оболочки и РНК в частице, решения некоторых проблем эволюции вирусов, создания новых противовирусных препаратов.

В настоящее время известны структуры 6 растительных вирусов, относимых к различным группам. Все изученные вирусы являются малыми, сферическими РНК-содержащими. Оболочки вирусных частиц составлены белковыми субъединицами, уложенными в соответствии с икосаэдрической симметрией на поверхности частицы [1].

Гомология аминокислотных последовательностей белков оболочек структурно изученных вирусов очень низкая, однако части белковых субъединиц, выстилающие собственно оболочку, имеют один и тот же структурный мотив - 8-полосный антипараллельный  $\beta$ -баррел.

CMtV является типичным представителем группы Carnovirus, впервые описанной Дж. Каррингтоном и Т. Моррисом [2]. Изометричные вирусы этой группы имеют широкий круг хозяев среди различных растений. Одним из таких растений для CMtV является декоративная гвоздика (*Dianthus caryophyllus* L.).

Вирусная частица состоит из белковой оболочки, молекулы геномной РНК и двух коротких негеномных фрагментов РНК [3]. Геномная РНК - одноцепочечная, линейная, с молекулярной массой  $1,4 \cdot 10^6$  кбс состоит из 4003 нуклеотидов. Оболочка частицы составлена 180 копиями белка одного вида с молекулярной массой 37787 Да, уложенными в соответствии с  $T = 3$  икосаэдрической симметрией. Аминокислотная последовательность белка оболочки определена по последовательности клонированной ДНК и включает в себя 348 аминокислотных остатков [4].

Предварительные структурные исследования [4, 5] показали, что белковая субъединица имеет два основных домена Р (projection) и S (shell), что аналогично белкам оболочки вирусов Tomato Bushy Stunt и Turnip Crinkle (TBSV, TCV) [6, 7]. Кроме того, при исследовании CMtV в растворе кривая малоуглового рентгеновского рассеяния показала наличие небольшой белковой плотности в области РНК внутри частицы, идентифицированной как R-домен [8].

Выделение препарата CMtV из *Dianthus caryophyllus* L. проводили по методике, описанной в [4, 8]. Кубические кристаллы получены методом диффузии в парах из растворов вируса с концентрацией  $\sim 50$  мг/мл в 0,1 М Tris-mal/NaOH-буфере при pH 5,03. В качестве осадителя применяли сульфат аммония с концентрацией 25% во внешней среде и 10% (w/v) в каплях. Кристаллы достигали 0,7-0,8 мм за 2-3 недели при комнатной температуре. Для уменьшения числа зародышей в капле добавляли до 1,5% (w/v) 1,7-гептандиола либо ПЭГа (м.м. 300).

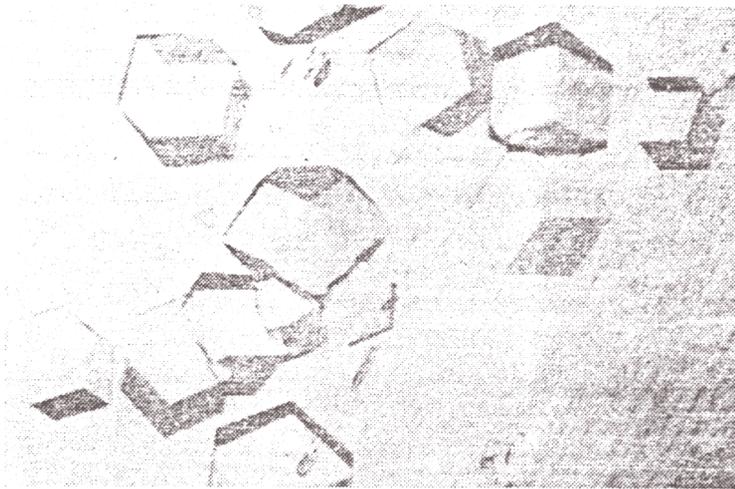


Рис. 1. Кубические кристаллы вируса Carnation Mottle

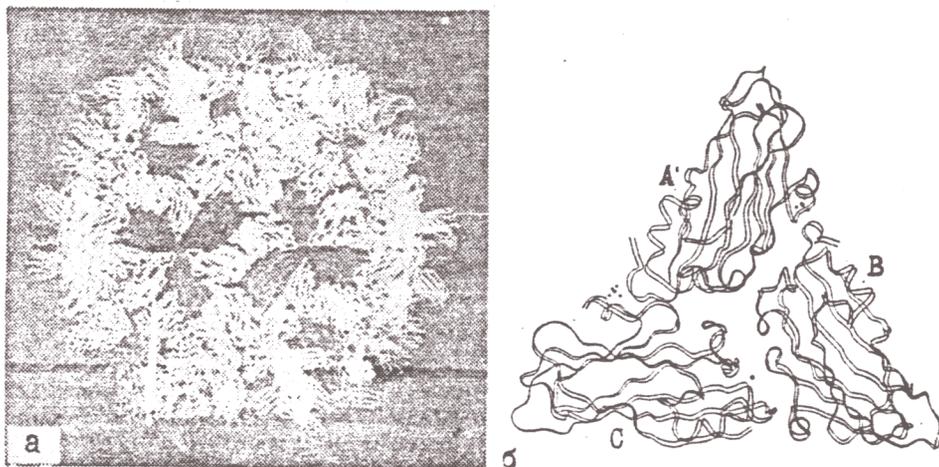


Рис. 2. Упаковка 180 белковых субъединиц в вирусном капсиде CMtV: *а* – вся частица; *б* – асимметричная единица икосаэдра с тремя квазиэквивалентными белковыми субъединицами А, В, С и ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $(\text{SO}_4)^{2-}$

Для решения структуры с разрешением до 3,5 Å были использованы набор рентгеноструктурных данных, полученных с кристаллов кубической формы (рис. 1). Эти кристаллы принадлежат пространственной группе  $I23$  с параметром элементарной ячейки  $A = 382 \text{ \AA}$  и двумя частицами в ячейке.

Полный набор рентгеноструктурных данных с разрешением 3,5 Å был получен с 4 кристаллов на станции синхротронного излучения X11 ЕМБЛ (с/о DESY, Гамбург). Впервые в вирусной кристаллографии регистрация отражений велась с помощью рентгеночувствительной пластины (FUJI, Япония). Параметры собранных наборов приведены в табл. 1 и 2.

Структура CMtV решена методом молекулярного замещения. По координатам атомов структуры TBSV был рассчитан стартовый набор фаз с разрешением от  $\infty$  до 6 Å. Усреднение электронной плотности относительно элементов некристаллографической симметрии и выравнивание растворителя проведены по комплексу программ усреднения Дж. Брикonia [9]. Успех в проведении этих процедур достигнут благодаря использованию программы автоматического определения областей, занятых белком и растворителем (процедура "автоматического определения оболочки") [10]. В нашем случае плотность РНК и растворителя была приравнена к их средним

Таблица 1

Основные показатели дифрактометрических наборов полученных с четырех кристаллов CMtV

Кристалл	Максимум разрешения, Å	Угол вращения	Число независимых рефлексов	$R(I)_{\text{сум}}, \%$	Полнота наборов, %
CMVL	6	$32 \times 1^\circ$	23 063	5,6	97,8
CMV1	3,5	$16 \times 0,5^\circ$	59 258	7,0	52,8
CMV6	3,5	$20 \times 0,5^\circ$	74 913	7,5	66,8
CMV7	3,5	$18 \times 0,5^\circ$	70 274	7,2	62,8

Таблица 2

Статистические показатели обработанного набора рентгеноструктурных данных с разрешением до 3,5 Å для кристаллов CMtV

Интервал разрешения, Å	Число независимых рефлексов	$R_1, \%$	$R_2, \%$
55,0)–8,68	7820	0,052	0,073
8,68–6,89	7720	0,063	0,067
6,89–6,02	7689	0,079	0,075
6,02–5,47	7636	0,080	0,079
5,47–5,08	6907	0,056	0,059
5,08–4,78	6867	0,058	0,061
4,78–4,54	6850	0,060	0,065
4,54–4,34	6918	0,068	0,069
4,34–4,18	6862	0,074	0,074
4,18–4,03	6837	0,088	0,085
4,03–3,91	6925	0,092	0,087
3,91–3,79	6892	0,109	0,102
3,79–3,69	6920	0,124	0,117
3,69–3,60	7034	0,138	0,129
3,60–3,52	6952	0,153	0,144

Примечание.  $R_1 = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$ ,  $R_2 = \frac{\sum (I - \langle I \rangle)^2}{\sum I^2}$ .

значениям. Расчеты новой оболочки повторяли каждые 10–11 циклов до стабилизации значения  $R$ -фактора усреднения ( $R_{\text{aver}} = \sum \| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc, den}} \| / \sum |F_{\text{obs}}|$ ). Все расчеты проведены на ЭВМ Сопух-2 в лаборатории молекулярной биофизики Оксфордского университета, в группе Д. Стюарта.

Повышение разрешения от 6 до 3,5 Å используемых рентгеноструктурных данных проводили шагами таким образом, что каждый последующий шаг удваивал количество используемых рефлексов. Весь процесс некристаллографического усреднения и расширения используемого разрешения от 6 до 3,5 Å потребовал 300 циклов, после чего  $R$ -фактор усреднения составил 11,8%. Рассчитанная на этом этапе карта электронной плотности с разрешением 3,5 Å позволила идентифицировать более 90% остатков аминокислотной цепи белка оболочки CMtV.

Встраивание аминокислотных остатков в эту карту проводили по комплексу программ FRODO на станции компьютерной графики ESVIO. Уточнение построенной

модели было проведено с использованием всех данных в области разрешения до 3,5 Å по комплексу программ XPLOR [11].

Стартовый кристаллографический

$$R\text{-фактор} = \frac{\sum \| F_{\text{obs}} | - | F_{\text{calc, corr}} \|}{\sum | F_{\text{obs}} |},$$

равный 35,4% за 250 циклов позиционного уточнения и 20 циклов уточнения температурного *B*-фактора, снизился до 21,2%. Для снижения его до 17,3% потребовалось провести дополнительно 70 циклов позиционного уточнения и 10 циклов уточнения *B*-фактора без введения молекул воды.

Проведенная после описанного уточнения проверка стереохимии показала значение для *rms* связей 0,019 Å, для углов 4,225°, для двугранных углов 29,8°.

Упаковка 180 белковых субъединиц на поверхности капсида CMtV приведена на рис. 2а. Белковая икосаздрически упорядоченная оболочка имеет толщину ~30 Å и 90 шипообразных выступов около выходов икосаздрических осей 2 и осей квази-2. В соответствии с обозначениями, введенными С. Харрисоном, субъединицы, группирующиеся вокруг выхода оси 5, названы А-субъединицами; С-субъединицы связаны икосаздрическими осями 2, а В-субъединицы — осями квази-2.

Каждая белковая субъединица состоит из двухосновных доменов S и P, связанных гибким шарниром *h* (hinge) (рис. 3). В отличие от структуры TBSV, а также некоторых известных ранее структур икосаздрических вирусов, карты электронной плотности, полученные нами при разрешении 3,5 Å, не выявили сколько-нибудь упорядоченной плотности для N-концевой части (первые 82 аминокислотных остатка последовательности) каждой из трех белковых субъединиц. В изученных ранее структурах аминоконцевая часть С-субъединиц хорошо прослеживалась на картах электронной плотности, образуя R-домен, проникающий в РНК, и N-концевую β-ленту (arm), образующую β-кольцевые структуры вокруг икосаздрических осей 3 (квази-6). Известно, что эти кольцевые структуры играют важную роль в механизме сборки вирусной частицы, создавая из С-субъединиц каркас, в который встраиваются А/В-димеры [12]. Отсутствие описанных β-колец в CMtV приводит к образованию более слабых контактов между субъединицами и созданию более рыхлой структуры вирусной оболочки.

Карта электронной плотности при разрешении 3,5 Å позволила однозначно проследить ход аминокислотной цепи для всех трех белковых субъединиц, начиная с 82-го остатка. Боковые группы хорошо вписаны в электронную плотность для всех остатков (рис. 4). Складчатость аминокислотной цепи во всех трех субъединицах одинакова, однако шарнир *h* между S- и P-доменами имеет две различные конфигурации: А/В и С/С, что приводит к существенным различиям во взаимодействии Р-доменов С-субъединиц и А/В-субъединиц.

Анализ карт электронной плотности показал, что S-домен состоит из 170 аминокислотных остатков (82 Ser — 251 Ala), далее следуют остатки, отнесенные нами к шарниру *h* (252 Ser — 259 Gly), и 89 остатков Р-домена.

Вторичная структура Р-домена представляет собой два антипараллельных β-листа (всего 10 β-лент) (рис. 3).

Большой β-лист, составленный из 6 β-лент, расположен около осей 2 и образует контакты с малым, 4-ленточным листом соседней субъединицы. В случае С-субъединиц конфигурация шарнира *h* такова, что Р-домен оказывается более наклонен к S-домену, чем в А- и В-субъединицах. Аналогичная структура наблюдалась и в белковых субъединицах TBSV [1]. Несмотря на совершенно различные аминокислотные последовательности Р-доменов TBSV и CMtV, характер вторичной структуры основной цепи в обеих субъединицах оказывается очень сходным.

Основным структурным мотивом S-домена, как и во всех изученных структурах растительных вирусов, является 8-полосный антипараллельный β-баррел, со-

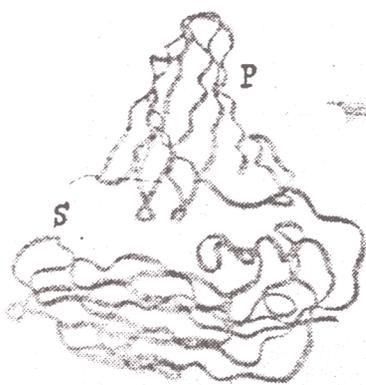
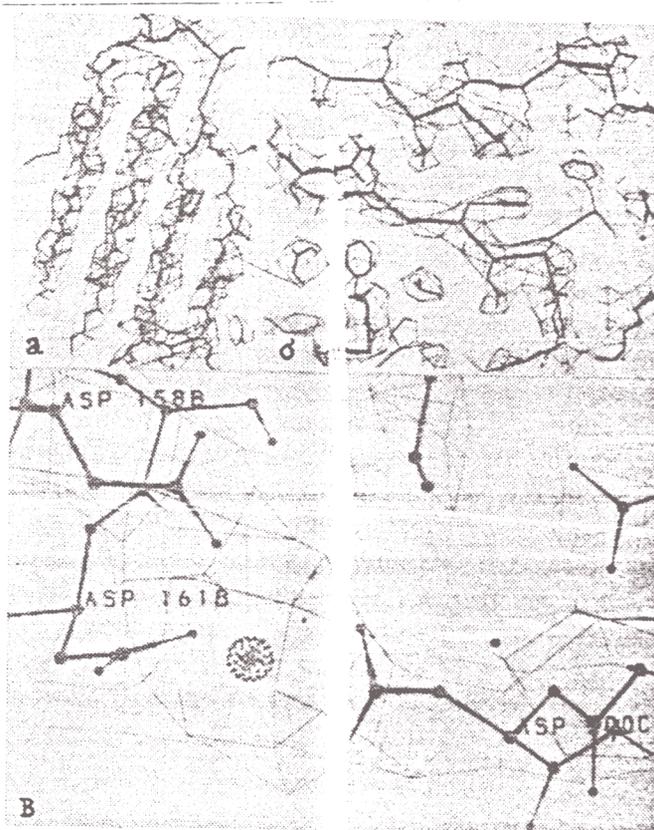


Рис. 3. Ленточная модель белковой субъединицы вируса CMtV

Рис. 4. Фрагменты уточненной карты электронной плотности с разрешением 3,5 А. а — участок плотности  $\beta$ -листа Р-домена; б — участок плотности спирального листа S-домена с вписанными боковыми группами; в — участок плотности иона  $Ca^{2+}$  с координирующими его остатками субъединиц С и В



стоящий из двух  $\beta$ -листов, один из которых скручен (рис. 3). Кроме восьми  $\beta$ -лент, в структуре имеются два  $\alpha$ -спиральных участка, расположенных так же, как и в структуре белка TBSV. Так же как и для Р-доменов, гомология аминокислотных последовательностей S-доменов TBSV и CMtV составляет всего 30%, однако и в этом случае вторичные структуры доменов очень сходны. Основные различия двух структур, как и ожидалось наблюдаются в петлях, соединяющих  $\beta$ -ленты. На карте электронной плотности в районах контактов между субъединицами наблюдаются три достаточно сильных пика (по одному между каждой парой субъединиц). Пики между А/В-субъединицами и А/С-субъединицами были интерпретированы как ионы сульфата. В районе контакта С- и В-субъединиц более сильная электронная плотность была интерпретирована как ионы  $Ca^{2+}$  (рис. 4), координируемые остатками Asp 158 и 161 В-субъединицы и Asp 200 С-субъединицы.

Координаты предположенных атомов ионов кальция и сульфата были успешно уточнены по программе XPLOR. Полученные данные подтвердили предположения,

выдвинутые С. Харрисоном [8], о наличии и месте координации ионов кальция в структуре оболочки СМтV. Однако неожиданным оказался тот факт, что два из трех предполагаемых ионов кальция между субъединицами А/В и А/С оказались заменены ионами сульфата.

Попарное сравнение субъединиц А, В, и С проведено по программам Д. Стюарта отдельно для Р- и S-доменов. Анализ результатов сравнения показал, что существенных различий в укладке полипептидной цепи как для S-, так и для Р-доменов трех субъединиц не наблюдается. Наибольшие различия обнаружены в участках цепей, обращенных к поверхности частицы и в районы контактов между субъединицами, при этом для боковых групп значение  $rms$  связей немного больше, чем для основной цепи. Для S-доменов А/В-субъединиц  $rms$  связей составило 0,64 Å, а для Р-доменов этих субъединиц — 0,32 Å. Повышение значения  $rms$  до 1,6 Å для координат атомов А/В наблюдалось в области остатков Lys 255 — Ser 257 шарнира h. В S-доме В-субъединицы наблюдается несколько иная конфигурация петли Gly 99 — Pro 120 по сравнению с этими участками в А- и С-субъединицах ( $rms_{A/B} = 1,2$  Å;  $rms_{B/C} = 2,65$  Å). Для всех S-доменов следует отметить участки цепи Ser 140 — Arg 150, Thr 218 — Gly 229 и Ser 240 — Lys 248 ( $rms > 3$  Å). Эти участки являются петлями, соединяющими β-ленты, чем и объясняется их большая подвижность.

Сравнение положений атомов, составляющих шарнир h, показало, что для субъединиц А/С и В/С рассчитанное значение  $rms$  составляет 8 Å. Изменение конфигурации шарнира h в С-субъединице объясняется наличием в этом районе иона кальция, координация которого остатками С- и В-субъединиц описана выше.

Сравнение Р-доменов в парах А/С и В/С показало увеличение значения  $rms$  до 1,47 Å.

Все растительные вирусы структура которых известна, имеют различные механизмы сборки частицы, однако во всех случаях основным районом взаимодействия белковой оболочки с внутренней РНК являются упорядоченные N-концевые части белковых субъединиц, связанных икосаэдрическими осями 2. Проведенное нами рентгеноструктурное исследование вируса СМтV показало, что в этом случае разупорядоченными оказались N-концевые части всех субъединиц. Кроме того, отличительными чертами структуры СМтV являются: область контакта S-доменов С/С-субъединиц; наличие в структуре только 60 ионов кальция между В- и С-субъединицами; отсутствие на картах электронной плотности с разрешением 3,5 Å упорядоченного участка, соответствующего β-ветвям и кольцевым структурам.

Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова  
Академии наук СССР, Москва

Поступило  
1 XI 1991

Лаборатория молекулярной биофизики  
Оксфордского университета, Великобритания  
Европейская лаборатория молекулярной биологии  
Гамбург, Германия

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Casper D.L.D., Klug A. — Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1962, vol. 27, p. 1 — 24.
2. Carrington J.C., Morris T.J. In: Plant Viruses. N.Y.: Plenum Press, 1988, vol. 3, p. 73.
3. Gulley H., Carrington J.C., Balazs E. et al. — Nucl. Acids Res., 1985, vol. 13, p. 6663—6667.
4. Моргунова Е.Ю., Кафтамова А.С., Кулинич А.В. и др. — ДАН, 1984, т. 276, № 1, с. 119—122.
5. Моргунова Е.Ю., Михайлов А.М., Никитенко А.В., Вайнштейн Б.К. — Мол. генет., микробиол. и вирусол., 1989, т. 3, с. 29—34.
6. Olson A.J., Bricogne G., Harrison S.C. — J. Mol. Biol., 1983, vol. 171, p. 61—93.
7. Hogle J.M., Mceda A., Harrison S.C. — Ibid., 1986, vol. 191, p. 625 — 638.
8. Morgunova Ye.Yu., Mikhailov A.M., Dembo A.T. — Studia Biophys., 1987, vol. 122, № 1/3, p. 71—76.
9. Bricogne G. — Acta crystallograph., 1976, vol. A 32, p. 832—847.
10. Deisenhofer H., Steigemann W. Ibid., 1975, vol. B31, p. 238—250.
11. Brunger A.T. In: Crystallographic Computing. Techniques and New Technologies. Oxford: Clarendon, 1988.
12. Sorger P.K., Stockly P.G., Harrison S.C. — J. Mol. Biol., 1986, vol. 191, p. 639—658.